Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 4, Oct- Nov 2021, p. 533-541

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۰، ص. ۵۴۱-۵۳۳

مقاله پژوهشی

بررسی خواص ضدمیکروبی و قابلیت زنده‌مانی *Lactobacillus plantarum* LZ95 در شرایط اسیدی و صفراوی

الهه عیسوندحیدری[۱]- حسین جوینده[۲]*- محمد حجتی[۲]- بهروز علیزاده بهبهانی[۳]- محمد نوشاد[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۰۲

چکیده

پروبیوتیک‌ها، مکمل‌های غذایی و میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف، اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان ایجاد می‌کنند. از جمله اثرات سلامت‌بخش آن‌ها می‌توان به متعادل کردن میکروفلور روده، پیشگیری از سرطان و اسهال، کاهش کلسترول و فشارخون، اصلاح عدم تحمل لاکتوز، بهبود سیستم ایمنی، کاهش نشانه‌های آلرژیک، مهار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و غیره اشاره نمود. هدف از این پژوهش، بررسی قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* LZ95 نسبت به اسید (pHهای ۲/۵، ۳/۵ و ۵)، توانایی رشد آن در غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی (۰/۲، ۰/۵، ۰/۸، ۱/۲ و ۳ درصد)، مقاومت آن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، تتراسایکلین، پنی‌سیلین و جنتامایسین و بررسی فعالیت ضدمیکروبی آن در برابر *لیستریا اینوکوا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشرشیا کلی* به روش لکه‌گذاری بود. نتایج نشان داد که باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در pHهای ۳/۵ و ۵ به‌ترتیب ۸۵/۳۵ و ۹۷/۶۹ درصد قابلیت زنده‌مانی داشت. نتایج نشان داد که باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در تمامی غلظت‌های نمک صفراوی مورد آزمایش (۰/۲، ۰/۵، ۰/۱، ۱/۲ و ۳ درصد) قادر به رشد بود. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی حساس بود. هاله عدم رشد میکروبی در برابر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *لیستریا اینوکوا* به‌ترتیب ۱۱/۳۰، ۷، ۱۰/۷۰ و ۸/۹۰ میلی‌متر بود. با توجه به قابلیت زنده‌مانی مناسب سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در شرایط اسیدی و صفراوی و همچنین فعالیت ضدمیکروبی آن علیه باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد، پیشنهاد می‌شود بعد از انجام تست‌های تاییدی بیشتر از این سویه به‌عنوان مکمل پروبیوتیکی در کشت‌های تخمیری و یا به‌عنوان کشت همراه در فرایند تولید محصولات غذایی تخمیری استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، نمک‌های صفراوی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک، روش لکه‌گذاری.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها توسط سازمان خواربار و کشاورزی و سازمان بهداشت جهانی به‌عنوان "میکروارگانیسم‌های زنده" تعریف شده‌اند که اگر به میزان کافی در بدن میزبان وجود داشته باشند، می‌توانند اثرات سلامت بخشی را ایجاد کنند (Brown *et al.*, 2004). باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)[۴] متداول‌ترین پروبیوتیک‌ها در چند دهه گذشته می‌باشند. آن‌ها میکروفلور مطلوب دستگاه گوارش هستند و بنابراین "به‌طورکلی ایمن" (GRAS[۵])، تلقی می‌شوند؛ همچنین به دلیل شرکت در فرآیند تخمیر، میکروفلور غالب محصولات تخمیری به‌شمار می‌آیند. پروبیوتیک‌ها از طریق تولید اسید لاکتیک، اسید استیک، H_2O_2، باکتریوسین، دی‌استیل و CO_2 نقش مهمی در حفاظت از مواد غذایی و مهار میکروارگانیسم‌های عامل فساد یا عوامل بیماری‌زای ناشی از مواد غذایی دارند (Angmo *et al.*, 2016). استفاده از باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک با قابلیت پروبیوتیکی همانند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* می‌توانند تعداد میکروب‌های مفید در محصولات غذایی را با بالا برده و از سویی دیگر به‌عنوان باکتری‌های سازگار، فلور میکروبی روده را نیز تغییر دهند (دلال و همکاران، ۱۳۹۴). در جنس لاکتوباسیلوس‌ها، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، از گروه هتروفرمنتاتیو و به‌عنوان یک گونه ناهمگون و تطبیق پذیر است که در انواع محصولات از جمله لبنیات، گوشت، ماهی و بسیاری از سبزی‌ها و گیاهان تخمیری یافت می‌شود. توانایی زنده ماندن گونه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در معده و روده انسان و سایر پستانداران به

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: hosjooy@asnrukh.ac.ir)

DOI: 10.22067/ifstrj.v17i4.85831
4 Lactic acid bacteria
5 Generally recognized as safe

اثبات رسیده است. از ویژگی‌های درمانی این‌گونه می‌توان به کاهش شیوع اسهال در مراکز مراقبت روزانه، کاهش درد و یبوست همراه با سندرم روده تحریک‌پذیر، کاهش نفخ، توانایی جابه‌جایی انتروپاتوژن‌ها از سلول‌های $Caco_2$ و تأثیر مثبت بر ایمنی کودکان مبتلا به HIV[1] اشاره نمود (Zago *et al*., 2011). باکتری‌های اسیدلاکتیک گروه وسیعی از باکتری‌های هستند که در فرآیند تخمیر مواد غذایی سنتی و صنعتی بسیار مؤثرند (طباطبایی یزدی و همکاران، a ۱۳۹۵). مکانیسم عمل پروبیوتیک به سه طریق انجام می‌شود. اولین مکانیسم تقویت سیستم دفاعی میزبان است که مهم‌ترین عامل در پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی و نیز درمان التهاب‌های روده‌ای به شمار می‌رود. این باکتری‌ها با تولید متابولیت‌های خاص، ترکیبات دیواره سلولی یا DNA سیستم ایمنی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Collado *et al*., 2009). دومین مکانیسم مربوط به تأثیر مستقیم بر پاتوژن‌ها و سایر میکروارگانیسم‌های مضر است (Kaur *et al*., 2002). پروبیوتیک‌ها مانع از چسبیدن پاتوژن‌ها به روده می‌شوند و در نهایت برخی از تولیدات میکروبی مانند توکسین‌ها و فراورده‌های تولیدی میزبان، مثل نمک‌های صفراوی و ترکیبات غذایی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Patel *et al*., 2010). ذکر این نکته در خور توجه است که مکانیسم عمل پروبیوتیک کاملاً به گونه باکتری وابسته است و تا به امروز گروه‌های عمل پروبیوتیک‌ها به‌طور کامل شناخته نشده‌اند (Burgain *et al*., 2011).

آش‌کارده به‌عنوان یک غذای تخمیری در منطقه جنوب غرب زاگرس شناخته شده است که با استفاده از گیاه محلی کاردین، آرد گندم، دوغ و برنج تهیه می‌شود. باکتری‌های خانواده اسیدلاکتیک عمده‌ترین میکروارگانیسم‌های آغازگر تخمیر خودبه‌خودی این محصول می‌باشند (طباطبایی یزدی و همکاران، b ۱۳۹۵). بنابراین هدف از این پژوهش، بررسی قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* LZ95 (جدا شده از آش کارده) در شرایط اسیدی و صفراوی، مقاومت آن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی و همچنین بررسی فعالیت ضدمیکروبی آن در برابر برخی سویه‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه سویه میکروبی

در این پژوهش، از سـویه میکروبی *لاکتوباسـیلوس پلانتاروم* که توسط روش‌های مبتنی بر کشت و مولکولی قبلا در پژوهش طباطبایی یزدی و همکاران b ۱۳۹۵، از غذای تخمیری آش کارده جداســازی، شـناسـایی و تعیین توالی شـده بود اسـتفاده شـد (طباطبایی یزدی و همکاران، b ۱۳۹۵).

آزمون مقاومت به اسید

آزمون مقاومت به اســید مطابق با روش نریمانی و همکاران (۱۳۹۳)، با اندکی تغییر انجام گردید. ابتدا ســویه *لاکتوباســیلوس پلانتاروم* به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شـد. باکتری‌های فعال شـده در محیط کشـت MRS[2] مایع توسـط سـانتریفیوژ یخچال‌دار مدل (Hermle) سـاخت کشـور آلمان با دور ۹۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. رسوب ایجاد شده دوبار توسط محلول نمک فسفات با خاصیت بافری (PBS) از شرکت Bioidea شست‌و شو داده شد و در نهایت مایع رویی (سوپرناتانت) دور ریخته شد. سوسپانسیون میکروبی توسط دستگاه اسپکتوفتومتر (Wpa، انگلستان) در طول موج ۶۲۰ نانومتر به جذب نوری ۰/۶ رسـید. ۵۰ میکرولیتر از سـوسـپانسـیون میکروبی به درون میکروتیوب حاوی ۴۵۰ میکرولیتر بافر فسـفات ریخته شـد که به‌عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شـــد. نمونه کنترل به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه‌گذاری شد. از HCl ۰/۱ نرمال توسط بافر فسفات اسیدهایی با pHهای ۲/۵، ۳/۵ و ۵ تهیه شـــد. در میکروتیوب های حاوی ۴۵۰ میکرولیتر بافر فســـفات اســـتریل با pH های موردنظر میزان ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی ریخته شد و همراه با نمونه کنترل انکوبه‌گذاری شد. پس از گذشت ۳ ساعت، برای نمونه کنترل تا 10^{-10} رقت سازی انجام شد. برای نمونه باpH= ۲/۵ تا رقت 10^{-5}، نمونه‌ی pH= ۳/۵ تا رقت 10^{-7} و برای نمونه با pH= ۵ تا رقت 10^{-10} رقیق سازی صورت گرفـت. در انتهـا از رقـت‌هـای موردنظر بـه میزان ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون در پلیت‌های حاوی MRS agar کشت خطی داده شد و بعد از ۲۴ ســاعت در جار بی‌هوازی و در دمای ۳۷ درجه ســانتی‌گراد انکوبه گذاری شد. تعداد باکتری *لاکتوبا سیلوس پلانتاروم* رشد یافته توسط کلنی کانتر شمارش شد. درجه زنده‌مانی سویه لاکتوباسیلوس از طریق مقایسه درصد کلنی‌های رشد کرده روی MRS agar با نمونه کنترل محاسبه گردید

آزمون مقاومت به نمک‌های صفراوی

آزمون مقاومت به نمک‌های صفراوی مطابق با روش طباطبایی یزدی و همکاران (۱۳۹۶)، با کمی اصلاح انجام شد. ابتدا سویه مورد نظر در محیط MRS مایع به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی فعال‌سازی شد. باکتری فعال شده توسط سانتریفوژ یخچال‌دار با دور ۹۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. رسوب ایجاد شده دوبارتوسط بافر فسفات استریل شست‌وشو داده شد و در نهایت مایع رویی دور ریخته شد. سوسپانسیون میکروبی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج

1 Human immunodeficiency virus

2 de Man Rogosa and Sharp

۶۲۰ نانومتر به جذب نوری ۰/۶ رسید و در محیط MRS agar حاوی ۰/۲، ۰/۵، ۰/۸، ۱/۲ و ۳ درصد نمک صفراوی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر تلقیح شد. نتایج بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط بی‌هوازی به صورت چشمی مشاهده شد.

بررسی حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

در این آزمون مطابق با روش جعفری و همکاران (۱۳۹۱)، تست حساسیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی انجام شد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده شامل: کلرامفنیکل[1] (۳۰ μg)، تتراسایکلین[2] (۳۰ μg)، پنی‌سیلین[3] (۱۰ μg)، و جنتامایسین[4] (۱۰ μg)، و روش بررسی، انتشار دیسک[5] بود. در نهایت، تشکیل هاله شفاف اطراف دیسک‌ها نشان‌دهنده عدم رشد سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود و به وسیله خط‌کش (بر حسب میلی‌متر) اندازه‌گیری شد

آزمون ضدباکتریایی به روش لکه‌گذاری

آزمون ضدمیکروبی لکه‌گذاری[6] به‌منظور تأیید فعالیت پروبیوتیکی سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به روش طباطبایی یزدی و همکاران (۱۳۹۴)، انجام شد. ابتدا *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در محیط MRS مایع به مدت ۲۴ ساعت در جار بی‌هوازی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و فعال‌سازی شد. سپس حدود ۵ میکرولیتر از سویه روی سطح محیط کشت BHI[7] Agar نقطه‌گذاری و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس سطح سویه توسط یک لایه آگار نرم که شامل ۱۰ میلی‌لیتر از آگار BHI+٪۷ بود و با سویه‌های شاخص بیماری‌زای غذازاد (*لیستریا اینوکوآ*[8]، *استافیلوکوکوس اورئوس*[9]، *اشرشیا کلی*[10]، *سودوموناس آئروژینوزا*[11]) که از قبل فعال‌سازی شد، تلقیح و پوشانده شد. نحوه فعال‌سازی سویه‌های شاخص به این صورت بود که باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی گرمخانه گذاری شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت هاله شفاف در اطراف نقاط تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مشاهده شد که نشان‌دهنده عدم رشد میکروارگانیسم‌های شاخص و فعالیت ضد باکتریایی سویه مورد نظر بود.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

بررسی نتایج این پژوهش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن و سطح احتمال ۵ درصد، با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به درصد زنده‌مانی سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در pH ۲/۵، ۳/۵ و ۵ به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که درصد زنده‌مانی سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از صفر تا ۹۷/۶۹ درصد متغیر بود. بیشترین زنده‌مانی سویه در pH= ۵ و کمترین درصد زنده‌مانی در pH= ۲/۵ مشاهده شد. نتایج نشان داد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از توانایی خوبی در برابر شرایط اسیدی برخوردار بود. شکل ۱، نمایی از رشد سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم در pH برابر با ۳/۵ را نشان می‌دهد.

جدول ۱- اثر pHهای مختلف (۲/۵، ۳/۵ و ۵) بر درصد زنده‌مانی سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

باکتری/ pH	۲/۵	۳/۵	۵
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	–	٪۸۵/۳۵± ۰/۵۰	٪۹۷/۶۹± ۰/۲۴



شکل ۱- نمایی از رشد سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در شرایط اسیدی.

نتایج مربوط به رشد سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در محیط‌کشت MRS آگار حاوی غلظت‌های مختلف (۰/۲، ۰/۵، ۰/۸، ۱/۲ و ۳ درصد)

1 Chloramphenicol
2 Tetracycline
3 Penicillin
4 Gentamicin
5 Disk diffusion
6 Spot On Lawn
7 Brain Heart Infusion agar
8 Listeria innocua
9 Staphylococcus aureus
10 Escherichia coli
11 Pseudomonas aeruginosa

نمک صفراوی در جدول ۲، آورده شده است. نتایج نشان داد که سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در تمامی غلظت‌های نمک صفراوی دارای رشد بود اما بیشترین و کم‌ترین رشد باکتری به ترتیب در غلظت ۰/۲ و ۳ درصد نمک صفراوی مشاهده شد.

نتایج قطر هاله عدم رشد سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی (جنتامایسین µg ۱۰، تتراسایکلین µg ۳۰، پنی‌سیلین µg ۱۰ و کلرامفنیکل µg ۳۰)، به روش انتشار دیسک در جدول ۳، آورده شده است. نتایج نشان داد که آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل با قطر هاله عدم رشد ۳۰/۱۰ میلی‌متر بیشترین اثر بازدارندگی را بر باکتری داشت. در شکل ۲، نمایی از اثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی بر رشد سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نشان داده شده است.

نتایج فعالیت ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر باکتری‌های شاخص بیماری‌زای غذازاد در جدول ۴، آورده شده است. هاله عدم رشد میکروبی در اطراف سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نشان‌دهنده عدم رشد میکروارگانیسم‌های شاخص مورد استفاده در این آزمون بود. بر اساس نتایج، هاله عدم رشد میکروبی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *لیستریا اینوکوا* به‌ترتیب ۱۱/۳۰، ۷، ۱۰/۷۰ و ۸/۹۰ میلی‌متر بود. بیشترین و کم‌ترین فعالیت بازدارندگی به ترتیب بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (گرم مثبت) و *اشرشیا کلی* (گرم منفی) مشاهده شد.

جدول ۲- اثر غلظت های مختلف نمک صفراوی بر زنده مانی سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

باکتری/ درصد نمک صفراوی	۰/۲	۰/۵	۰/۸	۱/۲	۳
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	+++++	++++	+++	++	+

- +++++: بسیار زیاد، ++++: زیاد، +++: نسبتا زیاد، ++: متوسط، +: کم

جدول ۳- اثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی بر رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (بر حسب میلی‌متر)

باکتری/ آنتی‌بیوتیک	کلرامفنیکل	جنتامایسین	تتراسایکلین	پنی‌سیلین
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۳۰/۱۰±۰/۲۸a	۱۵/۰۰±۰/۵۰c	۲۵/۳۰±۰/۷۲b	۲۵/۵۰±۰/۶۰c

نتایج حاصل از میانگین سه تکرار (آزمون آماری دانکن) در سطح معنی داری (p≤۰/۰۵) است و داده ها به صورت میانگین± انحراف معیار آورده شده است.

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۲- نمایی از اثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی بر باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*.

جدول ٤- قطر هاله بازدارندگی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد بر حسب میلی‌متر

باکتری	*لیستریا اینوکوا*	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*سودوموناس ائروژینوزا*	*اشرشیا کلی*
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۸/۹۰±۰/۴۲b	۱۱/۳۰±۰/۳۲a	۱۰/۷۰±۰/۶۶a	۷/۰۰±۰/۳۹c

نتایج حاصل از میانگین سه تکرار (آزمون آماری دانکن) در سطح معنی‌داری (p≤۰/۰۵) است و داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار آورده شده است. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.

اسید معده از اهمیت بسیار زیادی در جلوگیری از کلونیزاسیون میکروبی نامطلوب برخوردار است و نقش مهمی در کاهش میزان بقای میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا دارد. لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی که به میزان زیادی در معرض اسید معده قرار می‌گیرند از پاسخ‌ها و مکانیسم‌های مختلف سلولی برای تحمل شرایط نامناسب اسیدی معده، مانند پمپ‌های پروتون، ترمیم پروتئین‌ها برای آسیب DNA، تغییر در پوشش سلولی و متابولیسم تغییر یافته بهره می‌گیرند (Montoro *et al*., 2018).

نوری و همکاران (۱۳۹۷)، گزارش کردند که هیچ یک از جدایه‌های لاکتیک اسید باکتری‌ها در pH=۲ رشدی نداشتند. نتایج این پژوهشگران با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی داشت. در پژوهشی که توکلی و همکاران (۱۳۹۵)، انجام دادند از بین ۳۰۰ سویه لاکتوباسیلوس جدا شده از پنیر محلی مازندران، ۱۹ سویه توانایی بقا در شرایط pH=۲/۵ را دارا بودند. Kumar و همکاران (۲۰۱۵)، ۱۲ ایزوله لاکتوباسیلوس که قبلا از محصولات لبنی جداسازی شده بود را شناسایی و ویژگی‌های پروبیوتیکی آن‌ها را ارزیابی کرد. نتایج نشان داد که از بین سویه‌های ایزوله شده، ۵ سویه لاکتوباسیلوس (زنده‌مانی ۵۰ درصد) در pH=۳ توانایی رشد داشتند. در پژوهشی دیگر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در pH=۵ زنده ماندند اما در pH=۳ غیرفعال بودند. بنابراین می‌توان بیان داشت که سازگاری سلولی با محیط اسیدی باعث ایجاد تغییر در ترکیب‌های غشایی با افزایش چشمگیر اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع و همچنین تخمیر مالولاکتیک و تجمع هیستیدین داخل سلولی می‌شود (Landa-Salgado *et al*., 2019). مقایسه نتایج به‌دست آمده درباره مقاومت به اسید در لاکتوباسیلوس‌های مختلف مشکل است و دلیل این امر می‌تواند مربوط به متنوع بودن سویه‌ها، درجه حساسیت به شرایط اسیدی و همچنین شرایط و مواد مورد استفاده در آزمون‌ها باشد (نوری و همکاران، ۱۳۹۷).

مقاومت در برابر نمک‌های صفراوی یکی از مهم‌ترین معیارها در انتخاب پروبیوتیک‌ها است. روده کوچک و روده بزرگ حاوی غلظت نسبتاً بالایی از نمک‌های صفراوی هستند که برای سلول‌های زنده سمی می‌باشند (Tokatli *et al*., 2015). هنگامی که باکتری‌ها به روده کوچک برسند، در معرض شرایط ضدمیکروبی متعددی مانند آنزیم‌های پروتئولیتیک، پپتیدهای ضدمیکروبی و نمک‌های صفراوی قرار می‌گیرند. غلظت ۰/۳ درصد از نمک‌های صفراوی یک غلظت بحرانی است که به طور کلی برای انتخاب سویه‌های مقاوم مورد استفاده قرار می‌گیرد (Abid *et al*., 2018). نوری و همکاران (۱۳۹۷) گزارش کردند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* توانایی رشد در محیط کشت حاوی ۰/۳ و ۰/۵٪ نمک صفراوی را دارا می‌باشد. توکلی و همکاران (۱۳۹۵) میزان مقاومت جدایه‌های لاکتوباسیلوس را در غلظت‌های ۰/۳، ۰/۵، ۱و ۲ درصد نمک صفراوی بررسی کردند. این پژوهشگران گزارش کردند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (MT.ZH293) و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (MT.ZH993 وMT.ZH893)، نسبت به غلظت‌های متفاوت نمک صفراوی مقاوم بودند. باکتری پروبیوتیک مقاومت خود را در برابر نمک صفراوی از طریق خنثی کردن اثرات نمک صفراوی و کاهش سطح کلسترول خون در بیماران با کلسترول بالا که نتیجه تولید آنزیم‌های آبکافت کننده نمک صفراوی توسط باکتری پروبیوتیک است، به‌دست می‌آورد. نتایج این پژوهش‌ها با یافته‌های ما هم‌خوانی داشت. بنابراین بر اساس پژوهش‌های انجام شده، نرخ بقای متفاوتی برای سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ذکر شده است که نشان می‌دهد توانایی بقا در محیط‌های صفراوی، وابسته به نژاد و گونه است (Tokatli *et al*., 2015). نتایج مربوط به اثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی بر باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به این صورت گزارش شد: مقاوم به آنتی‌بیوتیک (قطر کمتر یا مساوی۱۴)، حساسیت نسبی (قطر ۱۵ تا ۱۹) و حساس (قطر بیش از ۲۰ میلی‌متر). مطابق با نتایج به‌دست آمده (جدول ۳) باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از حساسیت نسبی در برابر جنتامایسین برخوردار بوده و نسبت به کلرامفنیکل، تتراسایکلین و پنی‌سیلین حساس بود. Sharma و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است (Sharma *et al*., 2016). صادقی و همکاران (۱۳۹۵) نشان دادند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداشده از خمیرترش آرد کامل گندم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی حساس بود. Rajoka و همکاران (۲۰۱۷) طی پژوهشی باکتری‌های اسید لاکتیک را از شیر مادر جداسازی و شناسایی کرده و ویژگی‌های پروبیوتیکی آن را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که ۷ سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* از شیرمادر جدا و شناسایی شدند. پتانسیل پروبیوتیکی آن‌ها از جمله آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی نیز بررسی شد. اکثر جدایه‌ها به پنی‌سیلین، جنتامایسین، آمپی‌سیلین، استرپتومایسین، سیپروفلوکساسین و سفالوتوکسین مقاوم و دو سویه نیز نسبت به تتراسایکلین و اریترومایسین حساس بودند. نتایج نشان داد شیر مادر منبع بالقوه پروبیوتیک است. مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک خاص ممکن است به دلیل عدم وجود محل هدف آنتی‌بیوتیک خاص در سلول باکتری باشد (Abushelaibi *et al*., 2017). Yu و همکاران (۲۰۱۳) از کلم ترش چینی[1]، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را جداسازی کردند و به بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی آن پرداختند. آن‌ها در آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک دریافتند، باکتری به پنی‌سیلین حساس و نسبت به جنتامایسین مقاوم است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها به‌طور فزاینده تبدیل به یک نگرانی مهم در زمینه پزشکی شده است. مقاومت گسترده

1 Chinese sauerkraut

در برابر آنتی‌بیوتیک‌های دارویی مهم در بین باکتری‌های بیماری‌زا به یک تهدید جدی برای درمان بیماران تبدیل شده است. بنابراین، حساسیت آنتی‌بیوتیکی یک نیاز مهم برای پروبیوتیک‌ها است (Lee *et al.*, 2014).

فعالیت ضدمیکروبی پروبیوتیک‌ها به دلیل تولید ترکیباتی مانند باکتریوسین‌ها و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و هم‌چنین تولید اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک و اسید استیک می‌باشد. ترکیبات باکتریوسینی مانع از رشد باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و اسیدهای چرب هیدروکسی، اسیدهای آلی و هیدروژن پراکسید مانع از رشد باکتری‌های گرم منفی می‌شود. عمده‌ترین اثر ضدمیکروبی لاکتوباسیلوس‌ها تولید باکتریوسین می‌باشد. هیدروژن پراکسید، اسیدهای آلی و اتانول نیز از جمله موادی هستند که لاکتوباسیل‌ها با تولید آن‌ها می‌توانند اثر کشندگی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا داشته باشند (فلاح و همکاران، ۱۳۹۸). Hernandez و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* TF711 تولیدکننده ترکیبات شبه‌باکتریوسینی به نام پلانتاریسین[1] TF711 می‌باشد. این باکتری فعالیت ضدمیکروبی خوبی در برابر طیف وسیعی از باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد از خود نشان داد. Enan و همکاران (۱۹۹۶) در پژوهشی مشابه، فعالیت ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* UGI جدا شده از سوسیس خشک را بررسی کردند و مشاهده کردند این سویه با تولید ماده ضدمیکروبی پلانتاریسین UGI توانست اثر مهارکنندگی روی باکتری‌های بیماری‌زا داشته باشد. Ong و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* USM 8613 فعالیت ضدمیکروبی مناسبی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان داد. این پژوهشگران همچنین گزارش کردند که این باکتری در کمک به بهبود زخم، سرکوب عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* در محل زخم و افزایش ایمنی ذاتی میزبان می‌تواند مؤثر باشد. علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۹) پتانسیل پروبیوتیکی و ضدمیکروبی سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* L15 مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران فعالیت ضدباکتری این سویه در برابر باکتری *اشرشیا کلی* عامل عفونت ادراری را مورد تأیید قرار دادند.

نتیجه‌گیری

با توجه به قابلیت زنده‌مانی مناسب سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در شرایط اسیدی و صفراوی و همچنین فعالیت ضدمیکروبی آن علیه باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد، پیشنهاد می‌شود بعد از انجام تست‌های تاییدی بیشتر از این سویه به‌عنوان مکمل پروبیوتیکی در کشت‌های تخمیری و یا به‌عنوان کشت همراه در فرایند تولید محصولات غذایی تخمیری استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

توکلی، م. حمیدی اصفهانی، ز. حجازی، م.ا. عزیزی، م.ح. عباسی، س. توانایی پروبیوتیکی سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از پنیر محلی مازندران. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۱۳۹۵؛ ۱۱(۴): ۹۸-۸۹.

جعفری، ب. منادی، ع. رضایی، ع. علیزاده، س. احمدیزاده، چ. برزگری، ا. پاشازاده، م. جعفرزاده، ح. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز. ۱۳۹۱؛ ۶(۱): ۱۵۲۴-۱۵۰۵.

سلطان دلال، م.م. خشت زرین، ح.ر. تاج آبادی ابراهیمی، م. داود آبادی، ا. حکیمیان، م.م. صدر آبادی، ع.ا. شریفی یزدی، م.ک. جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های اسید لاکتیک با پتانسیل پروبیوتیکی در ماست‌های محلی استان یزد. طلوع بهداشت، دوماهنامه علمی پژوهشی دانشکده بهداشت یزد. ۱۳۹۴؛ ۱۴(۹۴): ۱۸۵-۱۷۳.

صادقی، ع. ابراهیمی، م. جداسازی، شناسایی و ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس‌های غالب در خمیر ترش کامل آرد گندم. مجله دنیای میکروب‌ها. ۱۳۹۵؛ ۹(۲): ۱۴۴-۱۳۳.

طباطبایی یزدی، ف. وسیعی، ع. علیزاده بهبهانی، ب. بررسی تنوع باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از کشک زرد زابلی (سیستانی) با استفاده از روش تکثیر ژن 16S rRNA. علوم و صنایع غذایی. ۱۳۹۵a؛ ۱۳(۵۹): ۳۶-۲۵.

طباطبایی یزدی، ف. وسیعی، ع. علیزاده بهبهانی، ب. مرتضوی، س.ع. طباطبایی یزدی، ف. بررسی تنوع جمعیتی باکتری‌های اسید لاکتیک آش کارده با استفاده از روش تکثیر ژن 16S rRNA و تعیین فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات شبه باکتریوسینی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. ۱۳۹۵b؛ ۱۳(۵۳): ۱۴-۱.

1 Plantaricin

طباطبایی یزدی، ف. وسیعی، ع. علیزاده بهبهانی، ب. مرتضوی، س.ع. بررسی تنوع زیستی باکتری‌های اسید لاکتیک دوغ محلی مشهد با استفاده از روش آنالیز ژن 16S rRNA و تعیین توانایی پروبیوتیکی سویه‌های جدا شده از آن. علوم و صنایع غذایی. ۱۳۹۶؛ ۱۴(۷۰): ۷۸-۶۷.

طباطبایی یزدی، ف. وسیعی، ع. علیزاده بهبهانی، ب. مرتضوی، س.ع. بررسی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از کیمچی تولید شده در ایران. ۱۳۹۴مجله دانشگاه علوم پزشکی قم؛ ۹(۵): ۲۲-۱۱.

فلاح، ف. مرتضوی، س.ع. طباطبایی یزدی، ف. بررسی خواص پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس برویس* سویه PML1 بر پایه توانایی چسبندگی آن به سلول‌های اپیتلیال روده. ۱۳۹۸؛ ۵(۱): ۵۳-۴۱.

نریمانی، ط. تاری‌نژاد، ع. جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌های پروبیوتیک از شیر و ماست سنتی گاومیش شهرستان خوی. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی. ۱۳۹۳؛ ۲۴(۳): ۲۲۴-۲۱۰.

نوری، ص. ناظری، س. حسینی، پ. جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از ریزوسفر ریشه برنج لنجان. فصلنامه علمی-پژوهشی زیست شناسی میکروارگانیسم‌ها. ۱۳۹۷؛ ۷(۲۷): ۷۱-۶۱.

Abid Y, Casillo A, Gharsallah H, Joulak I, Lanzetta R, Corsaro MM, et al. Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018; 108:719-28.

Abushelaibi A, Al-Mahadin S, El-Tarabily K, Shah NP, Ayyash M. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT-Food Science and Technology.* 2017; 79:316-25.

Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Falah F. Inhibition of *Escherichia coli* adhesion to human intestinal Caco-2 cells by probiotic candidate *Lactobacillus plantarum* strain L15. *Microbial Pathogenesis*. 2019; 136:103677.

Angmo K, Kumari A, Bhalla TC. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-Food Science and Technology*. 2016; 66:428-35.

Brown AC, Valiere A. Probiotics and medical nutrition therapy. Nutrition in clinical care: an official publication of Tufts University. 2004; 7(2):56.

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., and Scher, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial Applications. *Journal of food Engineering.* 2011; 104(4): 467-483.

Collado, M.C., Isolauri, E., Salminen, S. and Sanaz, Y. The impact of probiotic on gut health. *Current Drug Metabolism*. 2009; 10:68-78.

Enan G, El-Essawy A, Uyttendaele M, Debevere J. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. *International Journal of Food Microbiology*. 1996; 30(3): 189-215.

Hernandez D, Cardell E, Zarate V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*. 2005; 99(1): 77-84.

Kaur, I.P., Chopra, K., and Saini, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. European Journal of *Pharmaceutical Sciences*. 2002; 15(1): 1-9.

Kumar A, Kumar D. Characterization of Lactobacillus isolated from dairy samples for probiotic properties. Anaerobe. 2015; 33:117-23.

Landa-Salgado P, Caballero-Cervantes Y, Ramirez-Bribiesca E, Maria Hernandez-Anguiano A, Mariana Ramirez-Hernandez L, Espinosa-Victoria D, et al. Isolation and identification of potentially probiotic lactic acid bacteria for Holstein calves in the Mexican Plateau. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2019; 10(1):68-83.

Lee KW, Park JY, Sa HD, Jeong JH, Jin DE, Heo HJ, et al. Probiotic properties of Pediococcus strains isolated from jeotgals, salted and fermented Korean sea-food. *Anaerobe*. 2014; 28:199-206.

Montoro BP, Benomar N, Gómez NC, Ennahar S, Horvatovich P, Knapp CW, et al. Proteomic analysis of *Lactobacillus pentosus* for the identification of potential markers involved in acid resistance and their influence on other probiotic features. *Food Microbiology*. 2018; 72:31-8.

Ong JS, Taylor TD, Yong CC, Khoo BY, Sasidharan S, Choi SB, et al. *Lactobacillus plantarum* USM8613 Aids in Wound Healing and Suppresses *Staphylococcus aureus* Infection at Wound Sites. *Probiotics and Antimicrobial Proteins.* 2019:1-13.

Patel, A. K., Ahire, J. J., Pawar, S. P., Chaudhari, B. L., Shouche, Y. S., and Chincholkar, S. B. Evaluation of probiotic characteristics of siderophoregenic Bacillus spp. isolated from dairy waste. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2010; 160(1): 140- 155.

Rajoka MSR, Mehwish HM, Siddiq M, Haobin Z, Zhu J, Yan L, et al. Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. *LWT-Food Science and Technology*. 2017; 84:271-80.

Sharma P, Tomar SK, Sangwan V, Goswami P, Singh R. Antibiotic resistance of Lactobacillus sp. isolated from commercial probiotic preparations. *Journal of Food Safety*. 2016; 36(1): 38-51.

Tokatli M, Gülgör G, Bağder Elmacı S, Arslankoz İşleyen N, Özçelik F. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *BioMed Research International.* 2015; 2015: 1-8.

Yu Z, Zhang X, Li S, Li C, Li D, Yang Z. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2013; 29(3) :489-98.

Zago M, Fornasari ME, Carminati D, Burns P, Suàrez V, Vinderola G, et al. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*. 2011; 28(5):1033-40.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 4, Oct- Nov 2021, p. 533-541

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۰، ص. ۵۴۱-۵۳۳

Assessment of antimicrobial and viability of *Lactobacillus plantarum* LZ95 under acidic and bile conditions

E. Isvand Heydari[1], H. Jooyandeh[2*], M. Hojjati[2], B. Alizadeh Behbahani[3], M. Noshad[3]

Received: 2020.03.01
Accepted: 2020.06.22

Introduction: Probiotics are viable microbial food supplements that, when well-arranged in adequate amounts, confer a health advantage on the host. Probiotics have different positive health impacts such as equilibration of intestinal microbiota, prevention of cancer and diarrhea, reduction of cholesterol and blood pressure, adaptation to lactose intolerance, improvement of immune system, decrease of allergic symptoms, inhibition of pathogenic microorganisms etc. Lactic acid bacteria (LAB), are the most common bacteria introduced as probiotics.

Materials and methods: In this research, a strain of *Lactobacillus planetarium* LZ95 was utilized and its probiotic potential was evaluated. This strain had been isolated from a traditional Iranian fermented food known as Ash-Kardeh and had been identified using culture-dependent *methods* and *molecular* techniques. *Lactobacillus planetarium*, is one of the known LAB bacteria. The aim of this study was to evaluate the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* LZ95 in relation to its resistance to acid (pH 2.5, 3.5 and 5.5), its ability to grow in different bile salt concentrations (0.2, 0.5, 0.8, 1.2 and 3%), its resistance against *chloramphenicol*, tetracycline, penicillin and gentamycin antibiotics, and its antimicrobial activity against *Listeria innocua, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* by using “Lawn on the spot” method.

Results and discussion: Results shown that the viability of *Lactobacillus plantarum* ranged from 0 to 97.69 percent. The highest and the lowest bacteria viability were determined at pH=5 and 2, respectively. The results revealed that *Lactobacillus plantarum* was able to grow at all tested bile salt concentrations (0.2, 0.5, 0.8, 1.2 and 3%), and the lowest and the highest viability was found at 0.2 and 3 percent of bile salt levels, respectively. *Lactobacillus plantarum* was susceptible to all tested antibiotics. Results also shown that *chloramphenicol* with an inhibition zone diameter of 30.10 mm had the highest anticipation effect on the strain. Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* (gram positive) and *Escherichia coli* (gram negative) with inhibition zone diameters of 11.30 and 7 mm was the highest and the lowest, respectively. The inhibition zone diameter around the strain of *Lactobacillus plantarum* revealed its ability to inhibit the growth of selected pathogenic bacteria. Based on results, the inhibition zone diameter against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria innocua* were 11.30, 7.00, 10.70, and 8.90 mm, respectively. In general, the isolated strain of *Lactobacillus planetarium* LZ95 had an acceptable probiotic potential such as resistance to bile salt and acidic conditions, susceptibility to some commonly antibiotics, and appropriate antimicrobial activity against food pathogenic bacteria. Therefore, this strain can be used in food industry to produce functional food products.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, Bile salts, Resistance to antibiotic, Lawn on the spot method.

1. MSc. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
(*Corresponding Author Email: hosjooy@asnrukh.ac.ir)